

尿激酶受体抑制剂阿米洛利降低蛋白尿的实验研究

谢少庭 李绪城 唐小玲 史伟 章斌

【摘要】 目的 观察阿米洛利在脂多糖诱导小鼠短暂蛋白尿模型中对蛋白尿的影响,探讨其影响蛋白尿的机制。方法 构建脂多糖(LPS)诱导小鼠短暂蛋白尿模型,实验分为3组:正常对照组(Con)、LPS处理组、LPS与amiloride共同处理组(LPS+amiloride)。采用考马斯亮蓝法检测各组24 h尿蛋白,利用免疫荧光共聚焦、实时荧光定量PCR等技术,检测足细胞尿激酶受体(uPAR)蛋白和uPAR mRNA的表达情况。结果 LPS组24 h蛋白尿明显高于Con组[(4.12±1.06) mg vs. (1.35±0.68) mg; $t=2.77$, $P=0.000$]及LPS+amiloride组[(4.12±1.06) mg vs. (1.99±0.96) mg; $t=2.13$, $P=0.001$],均有统计学意义;LPS+amiloride组24 h蛋白尿与Con组相比无统计学意义($t=0.64$, $P=0.244$);激光共聚焦显微镜观察,LPS组足细胞uPAR表达明显高于Con组与LPS+amiloride组;LPS组uPAR mRNA表达明显高于Con组(2.12±0.35 vs. 1.04±0.14, $t=1.12$, $P=0.000$)及LPS+amiloride组(2.12±0.35 vs. 1.30±0.22, $t=0.82$, $P=0.000$),均有统计学意义。结论 阿米洛利可能通过抑制受损足细胞uPAR的表达,从而起到降蛋白尿的作用。

【关键词】 阿米洛利; 蛋白尿; 脂多糖类; 尿激酶受体

A Study of urokinase receptor inhibitor amiloride in reducing proteinuria XIE Shao-ting, LI Xu-cheng, TANG Xiao-ling, SHI Wei, ZHANG Bin. Department of Blood Purification, Shantou Centre Hospital, Shantou 515000, China

Corresponding author: SHI Wei, Email: xiest1981@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of amiloride on the proteinuria of the LPS mouse model of transient proteinuria. **Methods** To establish the LPS mouse model of transient proteinuria and divide the experiment into 3 groups, normal control group (Con), LPS induced group (LPS) and amiloride treated group (LPS+amiloride). The concentration of protein and the expression of urokinase receptor (uPAR) and the change of podocytes motility were detected by coomassiebluestaining, immunofluorescence method and real-time PCR, etc. **Results** Comparing with LPS group, the 24 h urine protein of proteinuria in LPS mice treated with amiloride[(4.12±1.06)mg vs. (1.99±0.96) mg; $t=2.77$, $P=0.001$] and Con group [(4.12±1.06) mg vs. (1.35±0.68) mg; $t=2.13$, $P=0.000$] were significantly reduced. Observed by confocal microscope, compared among the other two groups, a significantly increased induction of uPAR protein expression was observed in LPS induced group. Comparing with Con group, the expression of uPAR mRNA of LPS group was significantly increased (2.12±0.35 vs. 1.04±0.14, $t=1.12$, $P=0.000$). In contrast, the expression of uPAR mRNA in LPS mice treated with amiloride was significantly lower than in LPS group (2.12±0.35 vs. 1.30±0.22, $t=0.82$, $P=0.000$). **Conclusion** Amiloride could reduce the proteinuria of the LPS mouse model of transient proteinuria by inhibiting the induction of uPAR expression.

【Key words】 Amiloride; Proteinuria; Lipopolysaccharides; Urokinase receptor

蛋白尿是肾脏疾病最常见的临床表现,同时也是估测肾脏病进展和预后的重要指标^[1]。在蛋白尿发生机

制中,足细胞是一个核心细胞^[2]。有研究发现:尿激酶受体(urokinase receptor, uPAR)表达增加可导致足细胞活动增强并导致蛋白尿的产生,同时抑制uPAR表达,可以明显减少蛋白尿发生,这表明足细胞上uPAR在蛋白尿发生机制中有着其独特作用^[3]。阿米洛利(amiloride)是一种Na⁺通道阻滞剂,已作为利尿药在临床上使用。有研究提示:在克隆的肿瘤细胞株,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.22.075

作者单位:515000 广东省,汕头中心医院血液净化中心(谢少庭、李绪城、唐小玲);广东省人民医院肾内科(史伟、章斌)

通讯作者:史伟, Email: xiest1981@163.com

amiloride可抑制其uPAR的表达,从而降低细胞的活动力^[4-5]。小鼠脂多糖(LPS)蛋白尿模型是一种短暂蛋白尿模型,其产生蛋白机制目前主要认为LPS与足细胞Toll样受体4(TLR-4)结合,从而活化NF- κ B,使足细胞足突融合,导致蛋白尿的产生^[6]。本研究通过构建LPS诱导小鼠短暂蛋白尿模型,观察amiloride对LPS诱导小鼠短暂蛋白尿模型中蛋白尿影响及其对足细胞uPAR的表达的影响,探讨amiloride是否通过抑制uPAR表达从而起到预防及降低蛋白尿的作用。

材料与方法

一、实验动物

30只C57BL/6雄性小鼠,体重20~28g;实验动物由中山大学医学院实验动物中心提供,有动物合格证明。

二、实验试剂与材料

amiloride(Sigma,货号A3085),LPS(Sigma,批号:L2880),兔多克隆抗体uPAR(FL-290)、羊多克隆抗体synaptopodin(N-14)、FITC标记的兔抗羊IgG(美国Santa Cruz Biotech公司),山羊抗小鼠uPAR(AF-534)(R&D Systems公司),羊抗兔Alexa Fluor 546(美国Invitrogen公司),DAPI(上海罗氏公司),考马斯亮蓝(Sigma,美国),Trizol(Invitrogen,美国);SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit(TaKaRa,日本);微量RNA提取试剂盒、Rnase-Free DNA酶试剂盒(QAIGEN,德国)。

三、实验方法

1. LPS诱导小鼠短暂蛋白尿模型制作及24h尿液收集:30只C57BL/6雄性小鼠随机分为正常对照组(Con)、LPS处理组(LPS)、LPS与amiloride共同处理组(LPS+amiloride),每组10只。LPS组及LPS+amiloride组腹腔注射LPS 200 μ g,Con组给予等量生理盐水腹腔注射,LPS+amiloride组提前2d给予amiloride 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,Con组及LPS组每天给予等量生理盐水灌胃,并于第2天开始分别留取24h尿液。

2. 24h尿蛋白检测:考马斯亮蓝法:(1)标准曲线的制作:标准蛋白稀释:取5%蛋白原液1ml+49ml生理盐水变为1mg/ml标准蛋白液,按照浓度梯度(10%、20%、30%、40%、50%、60%)共配制6管,每管稀释液各取0.1ml,加考马斯亮蓝试剂液5ml,混匀,5min后比色;以A595nm为纵坐标,标准蛋白含量为(100、200、300、400、500 μ g),在坐标轴上绘制标准曲线。(2)尿蛋白检测操作:取尿液(测定管)及生理盐水(空白管)各0.1ml分别加考马斯

亮蓝试剂液5ml,混匀,5~10min后于595nm分光光度计下比色,读数值,查标准曲线。空白管调零。

(3)计算:24h尿蛋白量(mg)=蛋白结果 \times 尿量/100。

3. 免疫荧光激光共聚焦观察小鼠肾组织synaptopodin、uPAR蛋白表达:取新鲜小鼠肾组织行冰冻切片,厚度3 μ m;丙酮-20℃固定10min后PBS洗涤,0.5%Triton X-100透化20min,PBS洗涤;5%BSA室温封闭20min;加一抗兔多克隆抗体uPAR(1:100稀释)4℃孵育过夜,PBS洗涤。加二抗羊抗兔Alexa Fluor 546(1:100稀释)室温避光孵育1h,PBS洗涤。荧光显微镜下观察小鼠肾组织synaptopodin、uPAR蛋白表达情况。

4. RNA提取及uPAR mRNA(PLAUR mRNA)检测:用Trizol提取小鼠肾组织RNA,TaKaRa试剂盒(宝生物工程大连有限公司)将细胞RNA逆转录为cDNA。按照PrimeScript™ RT reagency Kit试剂盒(宝生物工程大连有限公司)说明配制PCR反应液,两步法PCR扩增,实时荧光定量PCR检测各组足细胞PLAUR mRNA表达情况。uPAR的引物:正义链为5'-AAGCCTGCAATGCCGCTATC-3',反义链为5'-GGGTGTAGTTGCAACACTTCAGGA-3'。

四、统计学处理

应用SPSS 13.0统计软件进行分析,计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,小鼠蛋白尿及uPAR mRNA用单因素方差分析及LSD-*t*检验进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

1. LPS诱导小鼠短暂蛋白尿模型中各组蛋白尿的变化:与Con组相比较,LPS组24h蛋白尿明显升高[(4.12 \pm 1.06)mg vs. (1.35 \pm 0.68)mg; $t=2.77$, $P=0.000$],有统计学意义;而与LPS组相比较,LPS+amiloride组尿蛋白明显降低[(4.12 \pm 1.06)mg vs. (1.99 \pm 0.96)mg; $t=2.13$, $P=0.001$],有统计学意义;LPS+amiloride组24h蛋白尿与Con组相比无统计学意义($P=0.244$),见图1。

2. amiloride对LPS诱导小鼠短暂蛋白尿模型中足细胞uPAR蛋白表达的影响:激光共聚焦显微镜观察,在LPS诱导小鼠短暂蛋白尿模型上,Con组足细胞特异性骨架蛋白Synaptopodin^[7]主要表达于肾小球足细胞,uPAR广泛存在于肾小管和小球,二者很少在肾小球足细胞上融合;而LPS组可见uPAR表达增加,荧光亮度较高,与足细胞特异性骨架蛋白Synaptopodin在肾小球足细胞上广泛融合;在LPS+amiloride组明显可见uPAR表达下调,荧光亮度降低,与足细胞特

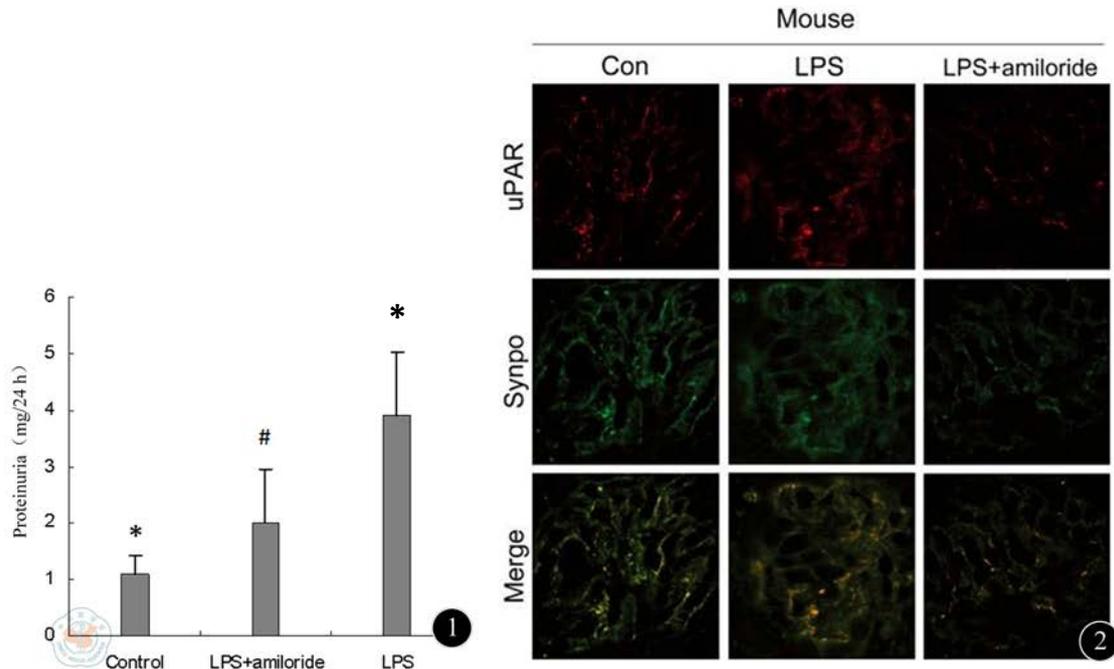


图1 不同组小鼠尿24 h尿蛋白蛋白水平比较。注：LPS组蛋白尿与Con组相比明显升高，具有统计学差异 ($P=0.000$)；LPS+amiloride组与LPS组相比，尿蛋白减少，具有统计学差异 ($P=0.001$) 图2 不同组LPS诱导小鼠蛋白尿模型中uPAR的表达及其定位 ($\times 400$) (小鼠骨架蛋白synaptopodin为绿色荧光羊多克隆抗体synaptopodin 标记，uPAR为黄色荧光Alexa Fluor 546标记)

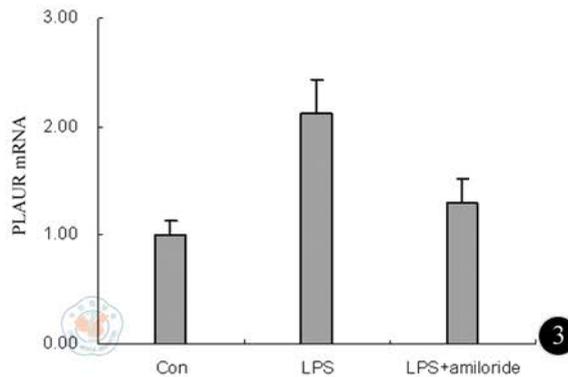


图3 定量PCR检测不同组小鼠uPAR mRNA的表达水平。注：与LPS组相比较，Con组、LPS+amiloride 组PLAUR mRNA表达明显增高，有统计学差异 (t 分别为1.12、0.82； P 值均为0.000)

异性骨架蛋白 Synaptopodin 在肾小球足细胞上融合减少。见图 2。

在 LPS 诱导小鼠短暂蛋白尿模型上，与 Con 组相比，LPS 组 PLAUR mRNA 表达明显增高，(2.12 ± 0.35 vs. 1.04 ± 0.14 , $t=1.12$, $P=0.000$)，有统计学意义；与 LPS 组相比较，LPS+amiloride 组 PLAUR mRNA 表达下调 (1.30 ± 0.22 vs. 2.12 ± 0.35 , $t=0.82$, $P=0.000$)，有统计学差异，见图 3。

讨 论

蛋白尿的多寡以及持续时间均直接关系肾脏疾病的预后，同时蛋白尿也是肾脏疾病及其他非肾脏疾病的独立高危因素。足细胞和蛋白尿几乎涉及了所有肾

小球疾病。足细胞作为肾小球固有细胞之一，附着于肾小球基底膜 (glomerular basement membrane, GBM) 的外侧，与肾小球基底膜以及毛细血管内皮细胞构成肾小球的滤过屏障。作为肾小球滤过膜的重要组成部分，足细胞的功能异常或损伤是导致蛋白尿发生和疾病进展的重要原因^[8-9]。足细胞已经成为针对蛋白尿研究的关键细胞。但目前临床上缺乏直接针对受损足细胞上靶分子治疗药物。

研究发现：受损足细胞可通过表达 uPAR 上调进而增强足细胞活动力而导致足突融合及蛋白尿的发生。小鼠 LPS 蛋白尿模型是一种短暂蛋白尿模型，一般给药后 24 h 蛋白尿产生，48 h 后蛋白逐渐消失，由于蛋白尿持续时间短，若等蛋白尿产生再给予药物治

疗, 效果欠佳, 因此我们研究组根据实验要求提前给予 amiloride。本研究通过构建 LPS 诱导短暂蛋白尿模型, 观察到 amiloride 能降低 LPS 诱导小鼠蛋白尿模型蛋白尿的发生, 并从 RNA 及蛋白质水平检测 uPAR 的表达, 发现 amiloride 均可以明显抑制 uPAR 的表达; 另外本课题组已在细胞水平上, 构建 LPS 损伤的足细胞, amiloride 能通过抑制 uPAR 的表达, 同时降低足细胞活动力, 稳定足细胞^[10]; 综上所述, amiloride 可以通过抑制足细胞 uPAR 表达, 降低足细胞活动力, 稳定足细胞, 起到降蛋白尿的作用。本研究首次发现 amiloride 具有降蛋白尿作用, 且是通过作用蛋白尿发生机制中的关键细胞——足细胞, 抑制足细胞 uPAR 的表达从而起到降蛋白尿作用, 为目前临床提供一种针对足细胞特异性分子治疗提供一种的降蛋白尿药物奠定实验基础。本研究目前已从动物水平及细胞水平证明 amiloride 有降低蛋白尿作用, 但目前尚未在人类疾病模型上证实 amiloride 具有降蛋白的作用, 目前尚无法真正在临床上受益, 拟以后在随机对照试验的临床研究中证实 amiloride 在人类是否具有降蛋白尿效果。

参 考 文 献

- [1] Asanuma K, Mundel P. The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol*, 2003, 7: 255-299.
- [2] Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signaling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 932-943.
- [3] Wei C, Moller CC, Altintas MM, et al. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nat Med*, 2008, 14: 55-63.
- [4] Wang Y, Jones CJ, Dang J, et al. Human urokinase receptor expression is inhibited by amiloride and induced by tumor necrosis factor and phorbol ester in colon cancer cells. *FEBS Lett*, 1994, 353: 138-142.
- [5] Wu S, Murrell GA, Wang Y. Interferon-alpha (Intron A) upregulates urokinase-type plasminogen activator receptor gene expression. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, 51: 248-254.
- [6] Sever S, Altintas MM, Nankoe SR, et al. Proteolytic processing of dynamin by cytoplasmic cathepsin L is a mechanism for proteinuric kidney disease. *J Clin Invest*, 2007, 117: 2095-2104.
- [7] Mundel P, Heid HW, Mundel TM, et al. Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol*, 1997, 139: 193-204.
- [8] Akhtar M, Mana H. Molecular basis of proteinuria. *Adv Anat Pathol*, 2004, 11: 304-309.
- [9] Jefferson JA. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney Int*, 2008, 74: 22-36.
- [10] 谢少庭, 史伟, 章斌, 等. 阿米洛利抑制脂多糖诱导的足细胞活动力. *中国新药与临床杂志*, 2011, 28: 814-818.

(收稿日期: 2013-09-26)

(本文编辑: 张志巍)

谢少庭, 李绪城, 唐小玲, 等. 尿激酶受体抑制剂阿米洛利降低蛋白尿的实验研究 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7 (22): 10154-10157.

中 华 医 学 会